

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA**

**CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**Triagem virtual de ligantes para a proteína  
lanosterol 14 alfa-desmetilase de *Leishmania infantum***

**NATALIA GABRIELA FONSECA**

**UBERLÂNDIA**

**2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA**

**CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**Triagem virtual de ligantes para a proteína**

**lanosterol 14 alfa-desmetilase de *Leishmania infantum***

**Natalia Gabriela Fonseca**

**Fisioterapia em Pesquisa**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
no formato de artigo científico como pré-requisito  
para obtenção do título de graduação em Fisioterapia  
da Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

Orientadora: Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

**UBERLÂNDIA**

**2019**

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

ADMET Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção E Toxicidade

AUC Área Sobre a Curva

CADD Design de Drogas Auxiliado por Computadores

CYP Superfamília P450

CYP51 Lanosterol 14-Alfa Demetilase

DM Docagem Molecular

HTS High Throughput Screening

NMR Ressonância Magnética Nuclear

OMS Organização Mundial Da Saúde

PCA Principal Component Analysis

PDB Protein Data Bank

ROC Receiver Operating Characteristic

SNC Sistema Nervoso Central

VS Virtual Screening

## RESUMO

A leishmaniose pode ser causada por espécies diferentes de protozoários do gênero *Leishmania*. Entre eles está o da *Leishmania infantum* que é o causador da Leishmaniose visceral. A Leishmaniose visceral, é uma das formas mais graves de leishmaniose e pode ser letal se não for tratada adequadamente. Os tratamentos atualmente disponíveis para a terapia da doença estão relacionados com muitos efeitos colaterais, esquema terapêutico complexo, alto custo e por vezes, pode resultar na não cura da doença, uma vez que tem sido observado o aumento de cepas resistentes. Esse estudo visa a busca de novos compostos com potencial farmacológico contra a Leishmaniose, por meio da busca por potenciais ligantes para a estrutura tridimensional da enzima lanosterol 14 alfa-desmetilase de *Leishmania infantum* (PDB id: 3L4D) que é um alvo validado na literatura. Utilizando o pacote de programas da OpenEye Scientific Software, Inc, e o banco de dados Drugs Now do ZINC, foi gerado uma Hit list dos 500 melhores compostos obtidos via virtual screening, sendo os melhores compostos selecionados de acordo com suas características de ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) geradas a partir do web server pkCSM

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecto-parassitária causada por um protozoário do gênero *Leishmania* e da família Trypanosomatidae. O protozoário da *Leishmania* pode ser encontrado na forma promastigota flagelada ou amastigota. Os protozoários são transmitidos pela picada do inseto flebotomíneo infectado, que inocula os promastigotas metacíclicos no hospedeiro. No hospedeiro eles invadem macrófagos, permanecem em fagolisossomos transformando-se em amastigotas. As células podem sofrer lise liberando as amastigotas que podem ser ingeridas pelo inseto vetor ou infectar outro macrófago e re-infectar o organismo.

As leishmanioses apresentam-se em duas formas clínicas diferentes, sendo a leishmaniose tegumentar responsável pela forma cutâneo-mucosa e a leishmaniose visceral pela forma visceralizante, afetando órgãos como fígado, baço, linfonodos e intestinos. A forma visceral é a forma mais grave da doença e causa morte na maioria dos casos.

A leishmaniose pode ser causada por espécies diferentes de protozoários do gênero *Leishmania*. Entre eles está o da *Leishmania infatum* que é o causador da Leishmaniose visceral. A Leishmaniose visceral, é uma das formas mais grave de leishmaniose e pode ser letal se não for tratada adequadamente (DESJEUX, 2004).

Há uma estimativa de 500 mil novos casos de Leishmaniose visceral e mais de 50.000 mortes pela doença cada ano. Em 2013 segundo dados divulgados pelo ministério da saúde brasileira foram 3253 casos notificados de leishmaniose visceral no Brasil

Os tratamentos atualmente disponíveis para a terapia da doença estão relacionados com muitos efeitos colaterais, esquema terapêutico complexo, alto custo e por vezes, pode resultar na não cura da doença, uma vez que tem sido observado o aumento de cepas resistentes. A resistência para as drogas anti-*Leishmania* sugere que a terapia baseada em um medicamento precisa ser revisada (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2012) e reforça a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

### Farmacóforos

Os farmacóforos são, por sua definição mais atual, um conjunto de características estéricas e eletrônicas, que são necessárias para garantir interações supramoleculares ótimas com um alvo biológico específico, ativando ou bloqueando sua resposta biológica

(WERMUTH et al., 1998). O conceito central farmacóforo envolve a noção de que o reconhecimento molecular de um alvo biológico por um grupo de compostos pode ser atribuída a um pequeno conjunto de características comuns que interagem com regiões complementares no alvo biológico, sendo estas características bastante gerais: doadores de ponte de hidrogênio, aceptores de pontes de hidrogênio, grupos carregados positiva e negativamente e regiões hidrofóbicas (LEACH et al., 2010). A modelagem de farmacóforos é uma técnica *in silico* bem estabelecida que gera muitos benefícios para pesquisas iniciais com desenhos de fármacos. Sua vantagens estão na visualização das características químicas supostamente importantes na interação proteína-ligante assim como a obtenção de compostos bioisostéricos estruturalmente diversos que não teriam sido descobertos por derivatização sistemática de compostos existentes (MARKT; SCHUSTER; LANGER, 2011).

### Ancoragem Molecular

A ancoragem macromolecular envolve a busca de modos de interação entre duas moléculas, como por exemplo interações proteína-proteína, proteína-ligante ou proteína-DNA. O sistema de ancoragem macromolecular proteína-ligante consiste de duas etapas: um algoritmo de busca conformacional que envolva todos os graus de liberdade do ligante (translacional, rotacional e conformacional) e uma função de pontuação que ranqueeie as prováveis posições espaciais para um composto ou vários provenientes de uma grande biblioteca (ROGNAN, 2011). Atualmente, a técnica dominante para a identificação de novos compostos líderes na descoberta de fármacos é a prospecção física de grandes bibliotecas de substâncias contra um alvo biológico.

Por conseguinte, a presente pesquisa tem como objetivo encontrar novos compostos com potencial farmacológico contra a Leishmaniose, por meio da busca por potenciais ligantes para a estrutura tridimensional da enzima lanosterol 14 alfa-desmetilase de *Leishmania infantum* (PDB id: 3L4D). Para tanto foram utilizadas ferramentas computacionais visando a construção de um modelo farmacofórico baseado no ligante fluconazol e posterior triagem virtual em bibliotecas de compostos.

## METODOLOGIA

### Geração de modelo farmacofórico baseado na forma do ligante

Visando a triagem virtual em bibliotecas de ligantes, um modelo farmacofórico foi gerado baseado na forma do ligante fluconazol em complexo com a lanosterol 14 alfa-desmetilase de *Leishmania infantum* (PDB id: 3L4D). Esta etapa foi realizada com ajuda do programa ROCS 3.2.0.4, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007). ROCs é um software baseado no método de comparação de forma, com base na ideia de que as moléculas têm forma semelhante se os seus volumes se sobrepõe adequadamente. Embora ROCS seja primariamente um método baseado em forma, pode-se definir para regiões específicas do modelo, características químicas descritas como: doadoras de hidrogênio, aceptoras de hidrogênio, aníons, cátions, hidrofóbicas e regiões de anéis aromáticos. Desta forma, foi formado um modelos farmacofóricos que durante processo de sobreposição facilitasse a identificação dos compostos que são semelhantes na forma e na química.

### Geração de banco de dados de confôrmeros de ligantes

O modelo famacofórico gerado por meio do programa ROCS foi usado na triagem virtual de bibliotecas de compostos originários de dois bancos de dados da Chembridge Corporation, San Diego, Califórnia, mais especificamente as bibliotecas DIVERSet™ EXP e CL que são cuidadosamente selecionadas para proporcionar a mais ampla cobertura do espaço farmacofórico e totalizam 100.000 composto de diversas estruturas *druglike*. Esta biblioteca de compostos foi submetido ao programa FILTER do OMEGA 2.5.1.4, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (HAWKINS et al., 2010). O FILTER é um programa de rápida filtragem e seleção de compostos que usa uma combinação de cálculos de propriedades físicas e o conhecimento de grupo funcionais. Ele foi usado antes da análise experimental para remover compostos indesejáveis, como compostos com funções tóxicas, com baixa biodisponibilidade oral, com alta

probabilidade de formar ligações covalentes com o alvo proteico e de compostos com probabilidade de interferência no ensaio experimental.

Os compostos da biblioteca filtrada por meio do FILTER foi submetidos ao programa QUACPAC 1.6.3.1, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (<http://www.eyesopen.com>) com o intuito de gerar compostos com cargas precisas ou pelo menos representadas de forma consistente. Para tanto, o QUACPAC enumera o pKa e os tautômeros de cada composto, a fim de obter os estados de protonação corretas.

Após a enumeração de pKa e tautômeros a biblioteca de compostos foi submetida a geração de conformeros por meio do programa OMEGA. O OMEGA gera bancos de dados de multi-confôrmeros bioativos de compostos com alta velocidade e confiabilidade. A geração de confôrmeros é um passo essencial para a triagem virtual utilizando modelos farmacofóricos, pois estes dependem de conformações bioativas para alcançar resultados satisfatórios.

#### Triagem virtual em banco de dados de compostos e validação

O modelo farmacofórico previamente gerado por meio do ligante fluconazol, serviu de base para triagem nas bibliotecas de ligantes. A triagem virtual foi realizada utilizando o programa ROCs e consiste em utilizar o modelo farmacofórico, baseado na forma, para a sobreposição moléculas advindas de bancos de dados de confôrmeros. O ROCS é uma técnica rápida e realiza a triagem virtual a uma taxa de 600-800 confôrmeros por segundo.

Para facilitar a compreensão exata, interpretação e comparação de triagem virtual o ROCS contém métodos de validação estatística dos resultados alcançados na triagem. Foi utilizado nesta validação a curva ROC (característica de operação do receptor) e AUC (área abaixo da curva). A curva ROC representa a comparação de compostos ativos versus decoys (ligantes não relacionados com o alvo proteico e potencialmente inativos) e a AUC, extraída do gráfico da curva ROC, é simplesmente a probabilidade de que um composto ativo escolhido aleatoriamente tenha uma pontuação maior do que compostos inativos escolhidos aleatoriamente. Para a construção da curva ROCS e obtenção do valor de AUC foram utilizados ligantes biologicamente ativos contra a proteína lanosterol 14

alfa-desmetilase sugerido por Reddy et al. (2013). Os decoys foram gerados na plataforma online DUD-E (MYSINGER et al., 2012) que utiliza ligantes ativos para gerar um conjunto de ligantes *decoys*. Desta forma, foi possível avaliar a qualidade o modelo farmacofórico gerado a partir do fluconazol, por meio da sobreposição e comparação dos resultados entre ligantes ativos e *decoys*.

### Análise das propriedades farmacocinéticas

As moléculas selecionadas foram submetidas ao web server PkCSM (PIRES et al. , 2015), onde as características de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade foram preditas.

## RESULTADOS

A validação do modelo confirmou a qualidade do modelo utilizado, com uma pontuação de AUC 0,799 , próximo ao limite estabelecido de 0,8. Isso demonstra a probabilidade de o modelo ser uma molécula ativa e não um falso positivo, categorizando-o como um resultado aleatório. A figura 1 mostra a curva obtida.

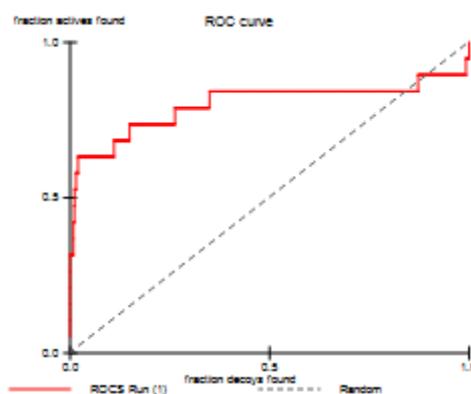


Figura 1. Curva AUC. Gráfico da curva gerada a partir da análise de compostos ativos (actives), e inativos (decoys).

A triagem resultou em 1000 compostos que obtiveram maior pontuação tanto quanto à similaridade estrutural (volume), como à proximidade espacial dos pontos farmacofóricos

(cores) em relação ao modelo, 500 compostos para cada biblioteca utilizada. As 16 de melhor score, sendo oito de cada biblioteca foram selecionadas. Os scores foram obtidos avaliando gráficos como o da figura 2.

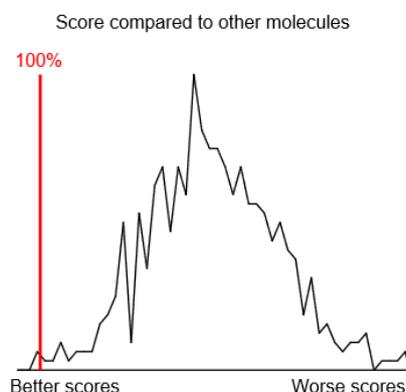


Figura 2. Gráfico da curva gerada a partir da análise do score da molécula output\_16597@2\_49 comparado com outras moléculas ancoradas.

As pontuações iguais ou maiores a 99% nas duas bibliotecas foram analisadas no web server pkCSM da universidade de Cambridge segundo as propriedades da tabela abaixo :

Tabela1:

Propriedade	Itens avaliados pelo pkCSM
Propriedades moleculares	Peso molecular, coeficiente de partição, ligações com rotação livre, aceptores, doadores, área superficial.
Propriedades de absorção	Solubilidade em água, permeabilidade em células de linhagem Caco-2, absorção intestinal, permeabilidade pela pele, substrato da Glicoproteína P(PGP), inibidor da PGP I, Inibidor da PGP 2.
Propriedades de distribuição	Volume de distribuição aparente, fração livre, permeabilidade à barreira hematoencefálica, permeabilidade ao SNC.
Propriedades de metabolização	Substrato da CYP2D6, substrato da CYP3A4, inibidor da CYP1A2, inibidor da CYP2C19, inibidor da CYP2C9, inibidor da CYP2D6 e inibidor da CYP3A4.
Propriedades de excreção	Clearance total ou depuração total, R-OCT2s substrato da OCT2 renal
Propriedades de toxicidade	Teste de AMES, dose máxima tolerada, inibidor da hERG I, inibidor da hERG II, toxicidade aguda oral em ratos, toxicidade crônica oral em ratos, hepatotoxicidade, sensibilização da pele, toxicidade em T. pyriformis, toxicidade em peixes.

Após o pkCSM fornecer os dados listados na tabela acima analisamos as propriedades relacionadas a toxicidade como método para selecionar os melhores compostos.

Tabela 2: Propriedades de toxicidade DVS.EXP

SMILES	AMES t	hERG I i	hERG II i	HP T	MDT
<chem>COc1ccc(cc1)Cn2c(nnc2O)Cc3ccncc3</chem>	No	No	No	Yes	1.192
<chem>Cc1ccccc1Cn2c(nnc2O)Cc3ccccc3F</chem>	No	No	No	No	2.434
<chem>c1ccc(c(c1)Cn2c(nnc2O)Cc3ccncc3)F</chem>	No	No	No	No	1.267
<chem>c1cc(sc1)CN(CCO)C(=O)[C@@H]2C[C@H]3C[C@@H]2C=C3</chem>	No	No	No	Yes	1.365
<chem>Cn1ccnc1CN(CCO)/C(=C/2\C=Nc3[n+]2cccc3)/O</chem>	No	No	Yes	No	0.895
<chem>CCn1cc(cn1)Cn2ccnc2c3ccc4c(c3)cco4</chem>	Yes	No	No	Yes	2.922
<chem>C[N@](Cc1n[nH]c(=O)n1Cc2ccc(cc2Cl)Cl)S(=O)(=O)C</chem>	Yes	No	Yes	Yes	1.493
<chem>c1ccc(cc1)C2(CCOCC2)C(=O)N3CCc4c3cccc4</chem>	No	No	No	No	1.027

\*AMES t significa teste de AMES, inibidor da hERG I, hERG2I inibidor da hERG II, Hpt hepatotoxicidade, MTD dose máxima tolerada

Tabela 3: Propriedades de toxicidade DVX. CL

SMILES	AMES t	hERG I i	hERG II i	HP T	MDT
<chem>COc1ccc(cc1)Cn2c(nnc2O)Cc3ccncc3</chem>	No	No	Yes	Yes	1.413
<chem>Cc1ccccc1Cn2c(nnc2O)Cc3ccccc3F</chem>	No	No	Yes	Yes	1.15
<chem>c1ccc(c(c1)Cn2c(nnc2O)Cc3ccncc3)F</chem>	No	No	No	Yes	2.051
<chem>c1cc(sc1)CN(CCO)C(=O)[C@@H]2C[C@H]3C[C@@H]2C=C3</chem>	No	No	No	No	0.88
<chem>Cn1ccnc1CN(CCO)/C(=C/2\C=Nc3[n+]2cccc3)/O</chem>	Yes	No	Yes	Yes	2.656
<chem>CCn1cc(cn1)Cn2ccnc2c3ccc4c(c3)cco4</chem>	Yes	No	Yes	Yes	0.719
<chem>C[N@](Cc1n[nH]c(=O)n1Cc2ccc(cc2Cl)Cl)S(=O)(=O)C</chem>	No	No	No	No	1.865
<chem>c1ccc(cc1)CN(CC2CC2)C(=O)c3cccc(c3)N</chem>	No	No	Yes	No	-0.011

\*AMES t significa teste de AMES, inibidor da hERG I, hERG2I inibidor da hERG II, Hpt hepatotoxicidade, MTD dose máxima tolerada

O AMES teste é amplamente empregado para avaliar o potencial mutagênico de compostos usando bactérias e portanto seu potencial carcinogênico. Nas duas bibliotecas quatro compostos foram caracterizados como possivelmente mutagênicos,

portanto não recomendados para futuras pesquisas invitro. Foram preditos como potenciais mutagênicos as moléculas:

- Cn1ccnc1CN(CCO)/C(=C/2\C=Nc3[n+]2cccc3)/O
- CCn1cc(cn1)Cn2ccnc2c3ccc4c(c3)cco4
- CCn1cc(cn1)Cn2ccnc2c3ccc4c(c3)cco4
- C[N@](Cc1n[nH]c(=O)n1Cc2ccc(cc2Cl)Cl)S(=O)(=O)C

A máxima dose tolerada é uma estimativa do limite da dose máxima. Expressa em Log(mg/kg/dia), valores iguais ou abaixo de 0,477 são considerados baixos, ou seja, a dose necessária para causar toxicidade é pequena. Nesse quesito apenas um composto não possuía dose consideravelmente baixa podendo causar toxicidade mais facilmente

- c1ccc(cc1)CN(CC2CC2)C(=O)c3cccc(c3)N.

A inibição dos canais de potássio codificados pelo gene hERG são as principais causas da síndrome do QT longo, podendo levar a uma arritmia ventricular fatal. Entretanto nenhum dos compostos possuíam potencial para inibição da hERG1 entretanto os compostos abaixo possuíam potencial inibição da hERG2:

- Cn1ccnc1CN(CCO)/C(=C/2\C=Nc3[n+]2cccc3)/O
- C[N@](Cc1n[nH]c(=O)n1Cc2ccc(cc2Cl)Cl)S(=O)(=O)C
- COc1ccc(cc1)Cn2c(nnc2O)Cc3ccncc3
- Cc1cccc1Cn2c(nnc2O)Cc3cccc3F
- Cn1ccnc1CN(CCO)/C(=C/2\C=Nc3[n+]2cccc3)/O
- CCn1cc(cn1)Cn2ccnc2c3ccc4c(c3)cco4
- c1ccc(cc1)CN(CC2CC2)C(=O)c3cccc(c3)N

Por fim foi avaliado a hepatotoxicidade que é um fator considerado no desenvolvimento de drogas, uma vez que lesões no tecido hepático causadas pelo uso crônico de fármacos são intensificadas com a duração do tratamento. Portanto os compostos com pouca ou nenhuma hepatotoxicidade são os indicados para tratamentos. Excluindo os que compostos que já foram contraindicados acima, os compostos que não eram hepatotoxicos são:

- Cc1cccc1Cn2c(nnc2O)Cc3cccc3F

- c1ccc(c(c1)Cn2c(nnc2O)Cc3ccncc3)F
- c1ccc(cc1)C2(CCOCC2)C(=O)N3CCc4c3cccc
- c1cc(sc1)CN(CCO)C(=O)[C@@H]2C[C@H]3C[C@@H]2C=C3
- C[N@](Cc1n[nH]c(=O)n1Cc2ccc(cc2Cl)Cl)S(=O)(=O)C

## CONCLUSÃO

Como foi mostrado anteriormente, conclui-se que o desenvolvimento de drogas com a utilização do virtual screening é o melhor método de alcançar resultados confiáveis, de maneira mais rápida e custo baixo. O resultado da técnica de PCA mostrou cinco prováveis compostos com potencial de combater a leishmania infantum baseadas nas moléculas encontradas na literatura:

- Cc1ccccc1Cn2c(nnc2O)Cc3ccccc3F
- c1ccc(c(c1)Cn2c(nnc2O)Cc3ccncc3)F
- c1ccc(cc1)C2(CCOCC2)C(=O)N3CCc4c3cccc
- c1cc(sc1)CN(CCO)C(=O)[C@@H]2C[C@H]3C[C@@H]2C=C3
- C[N@](Cc1n[nH]c(=O)n1Cc2ccc(cc2Cl)Cl)S(=O)(=O)C

Portanto as moléculas citadas acima são as mais indicadas para prosseguir com testes pré-clínicos para combate da leishmania infantum .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, set. 2004.

HAWKINS, P. C. D. et al. Conformer generation with OMEGA: Algorithm and validation using high quality structures from the protein databank and cambridge structural database. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 4, p. 572–584, 2010.

HAWKINS, P. C. D.; SKILLMAN, A. G.; NICHOLLS, A. Comparison of Shape-Matching and Docking as Virtual Screening Tools. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 74–82, 1 jan. 2007.

LAGUNIN, A. et al. PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances. **Bioinformatics**, v. 16, n. 8, p. 747–748, 2000.

LEACH, A. R. et al. Three-dimensional pharmacophore methods in drug discovery. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 2, p. 539–58, 28 jan. 2010.

MARKT, P.; SCHUSTER, D.; LANGER, T. Pharmacophore Models for Virtual Screening. In: **Virtual Screening**. [s.l.] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. p. 115–152.

MCGANN, M. FRED Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 3, p. 578–596, 28 mar. 2011.

MYSINGER, M. M. et al. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 6582–6594, 26 jul. 2012.

NEUDERT, G.; KLEBE, G. DSX: a knowledge-based scoring function for the assessment of protein-ligand complexes. **Journal of chemical information and modeling**, v. 51, n. 10, p. 2731–45, 24 out. 2011.

REDDY, K. K. et al. Shape and pharmacophore-based virtual screening to identify potential cytochrome P450 sterol 14 $\alpha$ -demethylase inhibitors. **Journal of receptor and signal transduction research**, v. 33, n. 4, p. 234–43, ago. 2013.

ROGNAN, D. Docking Methods for Virtual Screening : Principles and Recent Advances. In: **Virtual Screening**. [s.l.: s.n.]. p. 153–176.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 1, p. 53–63, 21 dez. 2012.